

**Forschungsförderung der Deutschen Wirbelsäulen-Stiftung  
Abschlussbericht**

**Antragstellerin:**

**Dr. med. Vanessa Hubertus**

Fachärztin für Neurochirurgie

Charité Universitätsmedizin Berlin

Charitéplatz 1, 10117 Berlin

E-Mail: [vanessa.hubertus@charite.de](mailto:vanessa.hubertus@charite.de)

**Gefördertes Projekt:**

**Entschlüsselung von Zell-Zell-Interaktionen mit Fokus auf die  
vaskuläre Regeneration nach traumatischer  
Rückenmarksschädigung**

**Datum des Zuwendungsbescheides: 16.12.2022**

## **Abschlussbericht Forschungsförderung der Deutschen Wirbelsäulen-Stiftung 2022**

### **Geförderte: Dr. med. Vanessa Hubertus**

#### **Einleitung:**

Die Traumatische Rückenmarksschädigung (Spinal Cord Injury, SCI) ist eine der häufigsten Ursachen für bleibende Behinderung weltweit. Jährlich sind mehr als 250.000 Menschen neu davon betroffen, und neben gravierenden Konsequenzen in der Einschränkung der Mobilität und Verringerung der Lebenserwartung für den Einzelnen stellt die Verletzung eine große Belastung für Gesundheitssysteme weltweit dar. Therapien sind limitiert auf supportive Behandlungen, eine Wiederherstellung der Funktion des geschädigten Rückenmarks ist bis dato nicht möglich. Experimentelle Studien, welche sich mit der endogenen Regeneration des Rückenmarks und deren Hemmnissen beschäftigen, konnten neben der neuronalen und axonalen auch eine partielle vaskuläre Regeneration nach SCI ausmachen, welche jedoch defizient ist, um eine strukturelle und funktionelle Erholung zu erzielen. Ziel einer globalen Forschungsanstrengung ist deshalb der Fokus auf eine potenzielle therapeutische Verbesserung dieser endogenen Regenerationsvorgänge. Das Zusammenspiel der Zell-Zell-Interaktionen in Bezug auf die vaskuläre Regeneration zu entschlüsseln, würde deswegen zu einer möglichen Identifikation von potenziellen Therapiezielen beitragen, um diese und damit die Regeneration von neuralem Gewebe zu verbessern.

#### **Zielsetzung:**

Ziel dieser Studie ist es, in einem Mausmodell nach traumatischer Rückenmarksschädigung die Regeneration der Blut-Rückenmarksschranke sowie der Neurovaskulären Einheit im zeitlichen Verlauf nach Clip-Kompressions-SCI über die akute – subakute bis in die chronische Phase zu untersuchen und mit detaillierten Single-Cell-Analysen zur Entschlüsselung der Zell-Zell-Interaktionen im Hinblick auf die vaskuläre Regeneration des Rückenmarks beizutragen, mit dem übergeordneten Ziel einer möglichen Identifikation eines translationalen Therapieansatzes.

#### **Methodik und Arbeitsprogramm:**

Um die Beziehung der einzelnen Zell-Zell-Interaktionen zu entschlüsseln, welche bei der vaskulären Regeneration der Blut-Rückenmarksschranke sowie der neurovaskulären Einheit zusammenspielen, wurden weiterführende Versuche mit der Durchführung von Single-Cell-RNA-sequencing geplant. Diese wurden in Kooperation mit dem Max-Dellbrück-Zentrum (MDC, Dr. Thomas Conrad) sowie des Berlin Institute of Health (BIH, Dr. B. Obermayer-Wasserscheid) durchgeführt. Zuvor fand eine gemeinsame Planung, sowie die Isolation von Nuclei in einem Test-Rückenmark (Region of interest, 1cm Länge) statt, wobei 64.500 Nuclei isoliert werden konnten, was als eine suffiziente Probenqualität eingestuft werden konnte, um erfolgreiche Genomanalysen durchzuführen. Es ergab sich für die hier beantragten Versuche folgendes Arbeitsprogramm:

## Abschlussbericht Forschungsförderung der Deutschen Wirbelsäulen-Stiftung 2022 Geförderte: Dr. med. Vanessa Hubertus

### Operativer Versuchsabschnitt:

In n=18 adulten, weiblichen C57BL6/J Mäusen wurden SCI bzw. Sham-Verletzung induziert (n=15 SCI, n=3 Sham). Anschließend wurden nach 1, 3, 7, 14 und 28d in jeweils n=3 SCI-Tieren und nach 24h in n=3 Sham-Tieren transkardiale Perfusionen mit PBS durchgeführt, sowie schnelle Organentnahmen auf Eis mit anschließender Weiterverarbeitung des Gewebes im Partnerzentrum Max-Dellbrück-Zentrum (MDC) Berlin. Bis zum Versuchsende erfolgten die tägliche Dokumentation des Tiergewichts sowie des neurologischen Status mittels BMS und Tally-Subscore (**s.Abb. 1**).

Zur Ergänzung dieser Versuche wurden aus eigenen Mitteln an diesen Zeitpunkten n=24 zusätzliche adulte, weibliche C57BL6/J Mäusen verwendet (n=4/Zeitpunkt, n=4 Sham, n=20 SCI), und für immunhistochemische Gewebeverarbeitung vorbereitet. Der Versuch war behördlich registriert und genehmigt (Reg-Nr. G0314/17, LAGeSo Berlin).

**Schädigungsmodell:** Es erfolgte eine gewichtsadaptiert Injektionsnarkose. Anschließend wurde zwischen den Scapulae eine etwa 0,5cm lange Hautinzision gesetzt. Nach Darstellung der Laminae und der Processus sponosi konnten die verbindenden Bandstrukturen durchtrennt werden und eine Laminektomie auf Höhe Th6 und Th7 durchgeführt werden. Die Identifizierung der gewünschten Höhe erfolgte über die A. radicularis magna in Höhe Th3-4. Die Tiere wurden randomisiert auf die Versuchsgruppen verteilt. Bei Tieren der Sham-Gruppe wurde nach Laminektomie mit dem Wundverschluss begonnen. Für Tiere der SCI-Gruppe wurde ein modifizierter Aneurysma-Clip (FEJOTATM, Joshi & Fehlings et al., 2002) für 60 Sekunden gleichmäßig, horizontal um das Rückenmark platziert. Dadurch wurde zirkumferent eine Kraft von 5kD auf das Rückenmark ausgeübt, um eine standardisierte und reproduzierbare Kompressions- und Kontusionsverletzung auszulösen. Im Anschluss erfolgten ausgiebige Spülung, Blutstillung, sowie schichtweiser Wundverschluss. Die postoperative Analgesie erfolgte mit Buprenorphin s.c. Die Tiere wurden für die Dauer des Versuchs mehrfach täglich durch geschultes Personal betreut, und täglich gewogen. Bei ausgefallener Blasenfunktion erfolgte die mehrfach tägliche manuelle Blasenentleerung. Eine antibiotische Prophylaxe zum Vorbeugen von Wundinfektionen und Harnwegsinfekten erfolgte mittels Amoxicillin/Clavulansäure im Trinkwasser über 7 Tage postoperativ.

## **Abschlussbericht Forschungsförderung der Deutschen Wirbelsäulen-Stiftung 2022**

### **Geförderte: Dr. med. Vanessa Hubertus**

**Gewebeakquise:** Zum Ende des Versuchs erfolgte eine transkardiale Perfusion mit PBS (Phosphat-buffered saline). Unter tiefer Narkose wurden in den linken Vorhof insgesamt 40 ml eisgekühltes, steriles PBS injiziert. Anschließend wurde mit dem Kadaver auf Eis das Rückenmark vorsichtig mit dem Gehirn als Widerlager nach Laminektomie der gesamten Wirbelsäule aus dem Spinalkanal gelöst und in eisgekühltes PBS gegeben. Das entnommene Rückenmark bis ca. 1cm um das Trauma herum wurde in zwei Abschnitte eingeteilt, direkt um das Trauma herum (bis 3mm): Epizentrum, R0; und weiter entfernt (3-10mm): Peritrauma-Bereich, R1. Es wurde eine möglichst schnelle Präparation zum Vorbeugen eines präparationsbedingten Verlusts von Nuclei durchgeführt, die Proben direkt nach Aufbereitung in flüssigem Stickstoff schockgefroren, und anschließend -80°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

**Single-Nuclei Sequenzierung:** In Zusammenarbeit mit dem Max-Dellbrück-Zentrum in Berlin wurden die gewonnenen Proben zunächst lysiert und die Nuclei isoliert. Im Anschluss wurde eine Kennzeichnung der Nuclei mit Gel Beads-in emulsions (GEMs) der Firma 10x Genomics vorgenommen und im Anschluss analog zum GEM-X Chip Workflow des Herstellers vorgegangen. Die Library wurde mittels Chromium-X Sequenzer konstruiert.

**Immunhistochemie:** Für das zusätzlich gewonnene Gewebe zur Durchführung der immunhistologischen Färbungen wurden nach entsprechender Einbettung der entnommenen Proben 10µm dicke Kryoschnitte angefertigt. Primäre Antikörper (CD31, Ki-67, GFAP, Iba1) wurden nach Blocking unspezifischer Antigene mit TBS/BSA auf den Schnitten für 24h bei 4°C inkubiert. Fluorophor-konjugierte Sekundär-Antikörper wurden lichtgeschützt für zwei Stunden auf die Schnitte aufgetragen. Nach dem Trocknen der Schnitte wurden sie mit IS Mounting Medium mit DAPI eingedeckt.

**FITC-Lectin-Perfusion:** Zur Identifizierung von funktionellen Blutgefäßen wurden randomisiert je n=4 ausgewählte Tiere pro Gruppe und Untersuchungszeitpunkt mit FITC-Lectin statt PBS perfundiert. Die FITC-Lectin-perfundierten Schnitte wurden unter möglichst reduziertem Lichteinfluss anschließend mit anti-CD31 und anti-Ki67 unter reduzierter Lichteinwirkung gefärbt.

**Fluoreszenzmikroskopie:** Für jede Färbung wurde die entsprechend angemessene Belichtungszeiten festgelegt. Anschließend wurden vier standardisierte Aufnahmen pro Schnitt, von beiden Vorder- und beiden Hinterhörnern, in 20-facher Vergrößerung aufgenommen.

### **Datenauswertung:**

**Bioinformatische Auswertung:** Die bioinformatische Auswertung der Single-nuclei Datenbank erfolgt in Kooperation mit der Core Unit Bioinformatics am Berlin Institute of Health, unter Verwendung von CellBender zum Clustering von Zellen mit ähnlichem Transkriptionsprofil und R mit R Studio 3.4.2. für die weiterführenden Analysen, wichtig hierbei vor allem die Identifikation von den am häufigsten

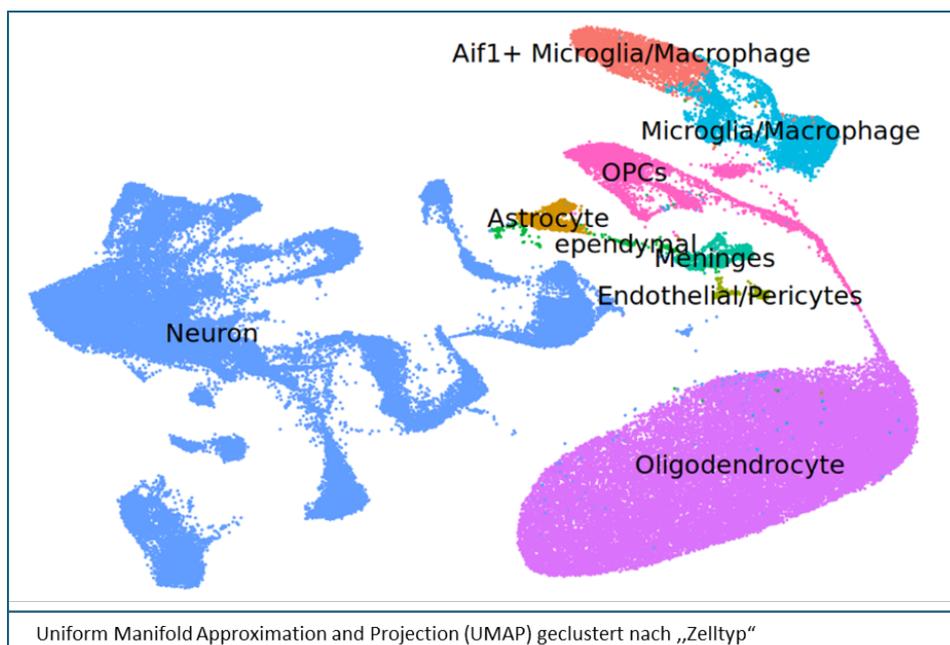
## Abschlussbericht Forschungsförderung der Deutschen Wirbelsäulen-Stiftung 2022 Geförderte: Dr. med. Vanessa Hubertus

exprimierten Genen pro Cluster (Markergene). Die Signalweganalyse erfolgte mithilfe von den Datenbanken KEGG, Reactome und GOBP.

**Histologische Auswertung:** Für die Analyse der Immunfluoreszenz-Aufnahmen wurde mit der Bildauswertungssoftware Cell-Profilier gearbeitet. Für jede Färbung wurde eine eigene Analysepipeline erstellt und die hierfür optimale Pixelgröße angepasst. Die statistischen Auswertungen erfolgten mithilfe der Programme Microsoft Excel 2023 und Graph Pad Prism Version 10 sowie R mit R Studio 3.4.2, mit dem Ziel einer explorativen Analyse bei einer Stichprobengröße von  $n=4$  und einem statistischen Signifikanzniveau von  $p<0,05$ . Für Analysen mit mehreren Messungen pro Tier wurden ANOVA Mixed-Effect-Modelle verwendet, um auch zufallsbedingte Effekte zu berücksichtigen.

### Ergebnisse:

In der Single-Nuclei-Analyse des gewonnenen Gewebes konnten insgesamt 39 Cluster mit individuell unterscheidbaren Transkriptionsprofilen identifizieren, die annotiert und acht verschiedenen Zelltypen zugeordnet werden konnten (**Abb.**). Im Folgenden ergänzen sich die Ergebnisse dieser Analyse (noch in Arbeit) bereits mit den ergänzenden und unterstützenden immunhistochemischen Untersuchungen, im Hinblick auf die zeitliche und örtliche Charakterisierung der Regeneration nach SCI.

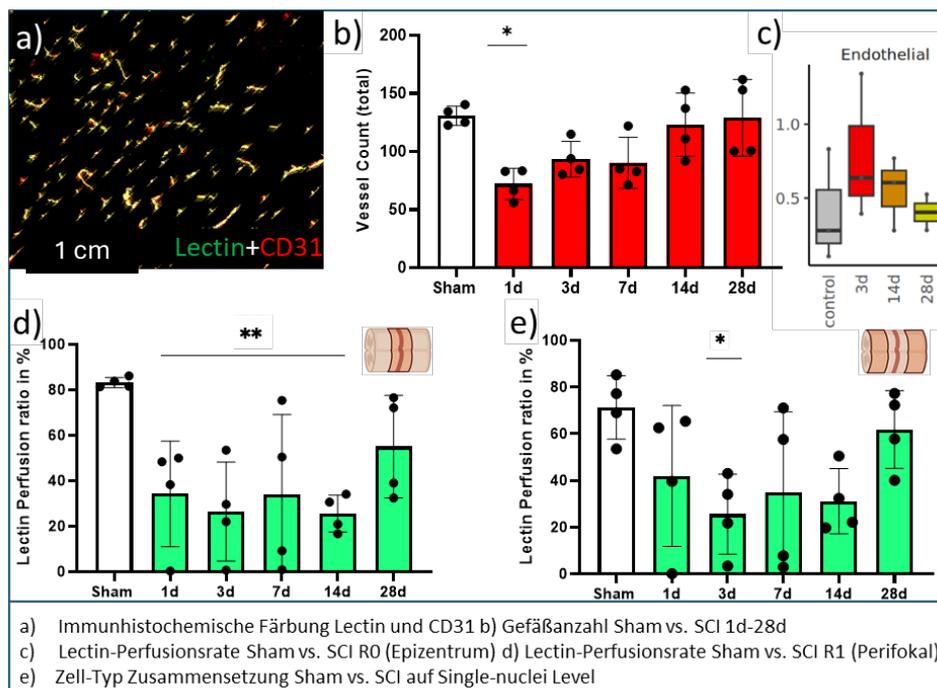


**Abb. 2:** Überblick über die annotierten und verschiedenen Zelltypen zugeordneten Cluster.

## Abschlussbericht Forschungsförderung der Deutschen Wirbelsäulen-Stiftung 2022 Geförderte: Dr. med. Vanessa Hubertus

### Untersuchungen der Vaskulären Verletzung und Regeneration nach SCI:

Die immunhistochemische Färbung für CD31 als Marker für Endothelzellen zeigte an Tag eins eine insgesamt Abnahme der Gefäßanzahl, die jedoch bereits am dritten Tag nicht mehr statistisch signifikant nachweisbar war (**Abb. 3b**). Auch auf Single-Nuclei-Niveau ließ sich an Tag drei keine Abnahme der Gefäßdichte feststellen (**Abb. 3c**). Die Kolokalisations-Analyse mit FITC-Lectin (**Abb. 3a**) zeigte jedoch, dass die funktionelle Perfusion der Gefäße im Epizentrum des Traumas bis zu Tag 14 signifikant geringer war als in den Vergleichstieren (**Abb. 3d**). Auch in der Peritrauma-Region kam es zu einer Abnahme der funktionellen Gefäßperfusion, mit einem Höhepunkt am dritten Tag (**Abb. 3e**). Bis Tag 28 kam es im Epizentrum (R0) nicht zu einer vollständigen Restitution der funktionellen Gefäßdichte, während in der Peritrauma-Region (R1) eine Angleichung an das Sham-Niveau zu beobachten war.

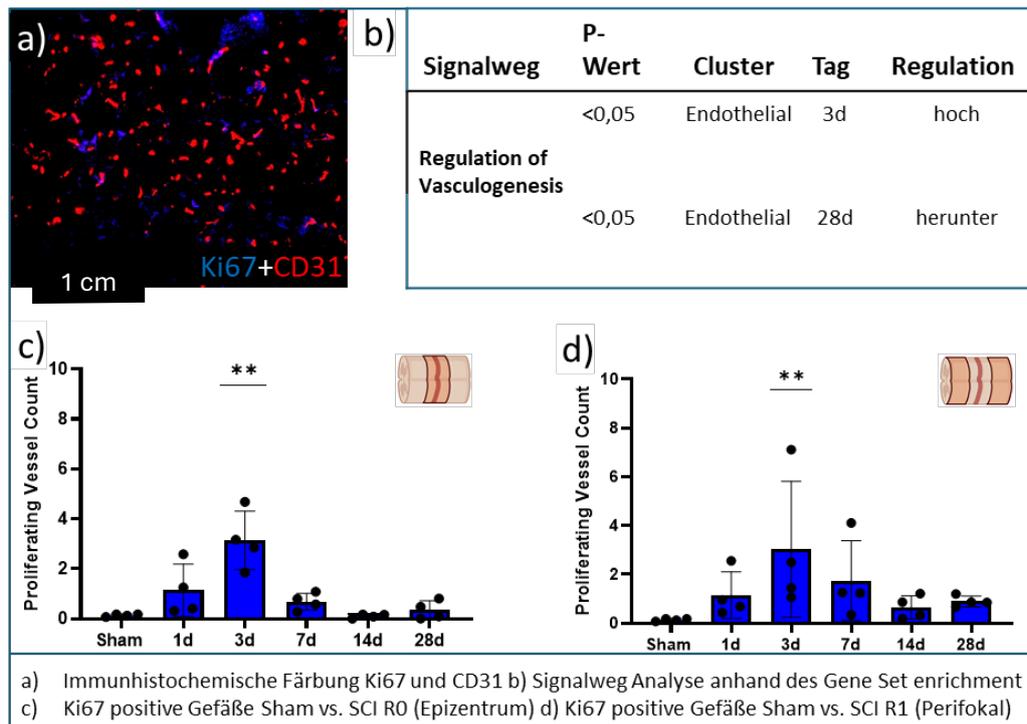


**Abb. 3a-e:** Untersuchungen zu vaskulärer Verletzung und Regeneration im zeitlichen und räumlichen Verlauf nach SCI.

Ki67, ein Marker für Zellproliferation, wurde bei Koexpression mit CD31 als Indikator für stattfindende Revaskularisation gefärbt (**Abb. 4a**). Am dritten Tag nach Trauma zeigte sich in beiden Zielregionen eine signifikante Expression von Ki67, als Anzeichen für relevant stattfindende Gefäßregeneration. Im direkten Vergleich zeigte sich, dass die absolute Expression im Peritrauma-Bereich (R1) ausgeprägter war als im Epizentrum (R0, **Abb. 4c+d**). Die zelluläre Regulation der Vaskulogenese wurde mittels Signalweg-Analyse der Single-Cell-Datenbank untersucht und war passend hierzu am dritten Tag

**Abschlussbericht Forschungsförderung der Deutschen Wirbelsäulen-Stiftung 2022**  
**Geförderte: Dr. med. Vanessa Hubertus**

signifikant im Cluster der Endothelzellen hochreguliert. An Tag 28 wurde derselbe Signalweg gehemmt (**Abb. 4b**).



**Abb. 4a-d:** Untersuchungen zur Gefäßproliferation im zeitlichen und räumlichen Verlauf nach SCI.

**Untersuchung von Neuroinflammation nach SCI:**

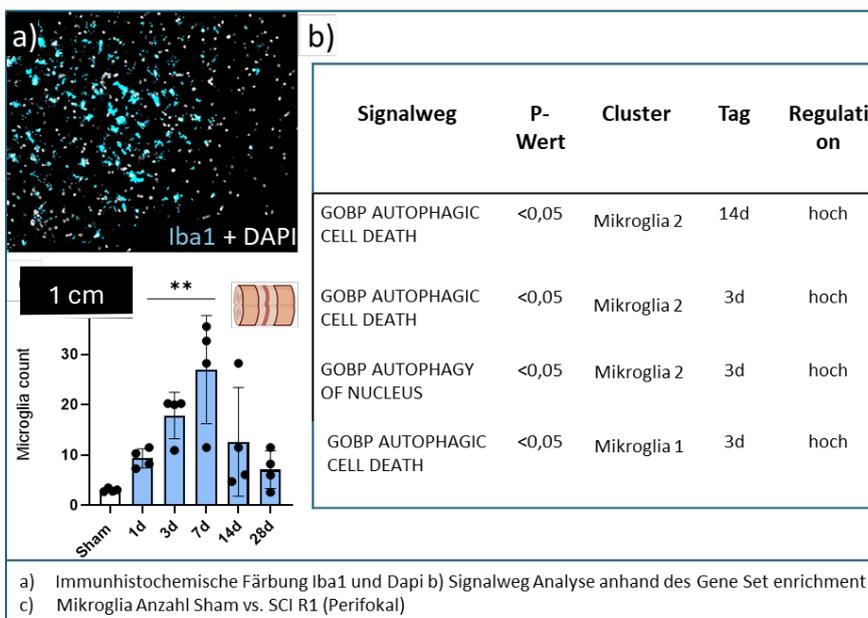
Die relevanten Cluster mit einer signifikanten Beteiligung an stattfindender Neuroinflammation konnten mittels Signalweg-Analyse identifiziert werden (**Abb. 5**). Mikroglia sind bekanntermaßen mitunter Hauptakteure in der Einleitung von inflammatorischen und apoptotischen Prozessen, während die angeborene Immunantwort auch teilweise durch Astrozyten eingeleitet wird. Eine reaktive Hochregulation von Inflammationsmechanismen war passenderweise am dritten Tag zu beobachten. An den Tagen 14 und 28 kam es zu einer negativen Regulation dieser Prozesse.

**Abschlussbericht Forschungsförderung der Deutschen Wirbelsäulen-Stiftung 2022**  
Geförderte: Dr. med. Vanessa Hubertus

Signalweg	P-Wert	Cluster	Tag	Regulation
NEGATIVE REGULATION OF NEUROINFLAMMATORY RESPONSE	<0,05	Mikroglia	14d	hoch
NEGATIVE REGULATION OF NEUROINFLAMMATORY RESPONSE	<0,05	Mikroglia	28d	hoch
REACTOME THE NLRP3 INFLAMMASOME	<0,05	Astrozyten	3d	hoch
INFLAMMATORY CELL APOPTOTIC PROCESS	<0,05	Mikroglia	3d	hoch

**Abb. 5:** Signalweg-Analyse von Mikroglia im zeitlichen Verlauf nach SCI.

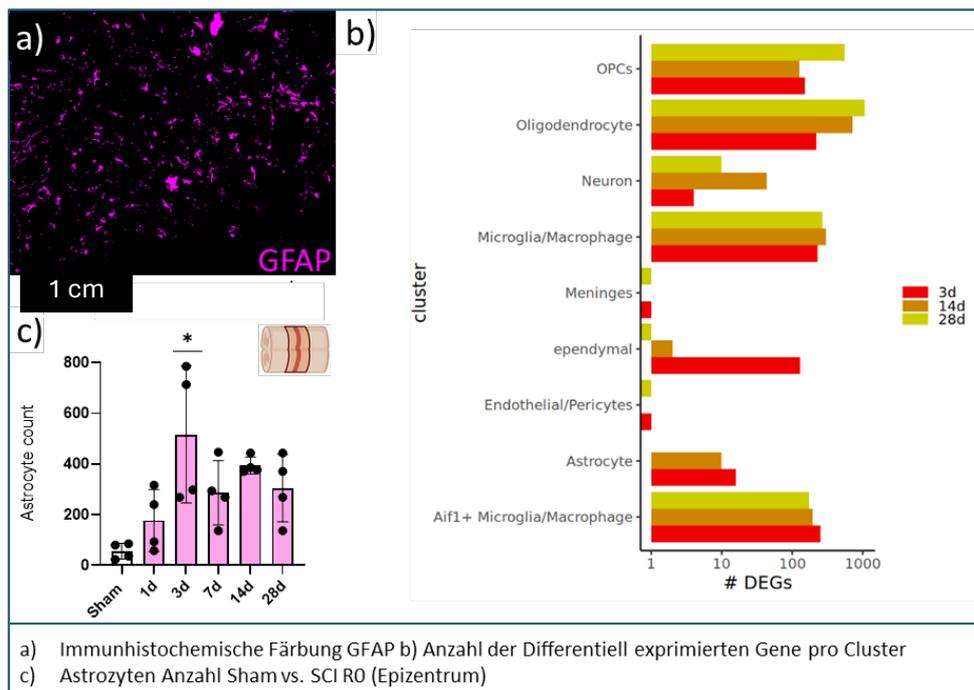
In der immunhistochemischen Darstellung mittels Iba1-Färbung zeigte sich ein Anstieg der Mikroglia-Anzahl am dritten und siebten Tag nach SCI (**Abb. 6a**). Diese Mikroglia führten zum Untergang von vormals gesunden Zellen nach drei und 14 Tagen. Die als Mikroglia 2 benannte Aif-positive Subpopulation war bis Tag 14 an der Hochregulation dieser Prozesse beteiligt, und die Subpopulation Mikroglia 1 am dritten Tag nach Trauma (**Abb. 6b**).



**Abb. 6a-b:** Analyse der Entwicklung der Mikroglia-Anzahl im zeitlichen Verlauf nach SCI.

## Abschlussbericht Forschungsförderung der Deutschen Wirbelsäulen-Stiftung 2022 Geförderte: Dr. med. Vanessa Hubertus

Bezüglich der Untersuchung der Entwicklung von reaktiven Astrozyten ließen sich sowohl in der Peritrauma-Region (R1) als auch im Epizentrum (R0) ab dem dritten Tag nach SCI Akkumulationen GFAP-positiver reaktiver Astrozyten nachweisen (**Abb. 7a+c**). Die Anzahl der differentiell exprimierten Gene war innerhalb dieses Clusters von geringer Anzahl, an einer Analysemethode wird aktuell gearbeitet (**Abb. 7c**).

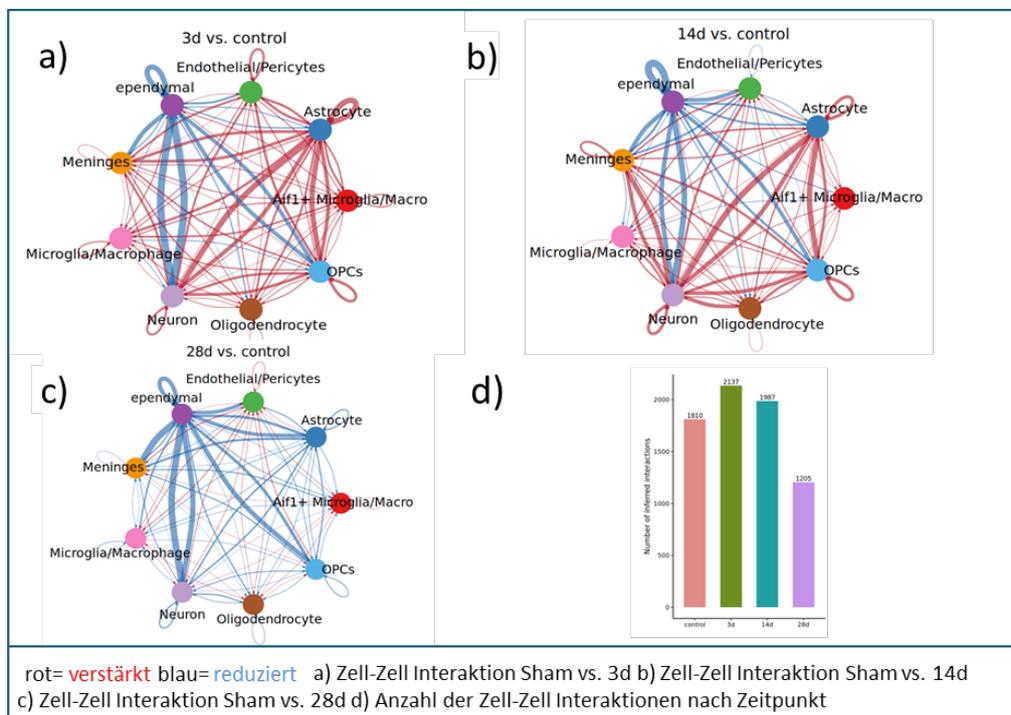


**Abb. 7a-c:** Analyse der Entwicklung reaktiver Astrozyten im zeitlichen Verlauf nach SCI.

### Untersuchung interzellulärer Interaktionen:

Als nächster Schritt erfolgte die Auswertung der interzellulären Interaktionen im zeitlichen Verlauf nach SCI. An den Tagen drei (**Abb. 8a**) und 14 (**Abb. 8c**) war die Intensität dieser Interaktionen im Vergleich zur Kontrollgruppe zwischen Astrozyten, Neuronen und OPCs intensiviert, und zeigte sich nach 28 Tagen zwischen allen identifizierten Zelltypen herabgesetzt (**Abb. 8c**). Für beide Mikroglia-Populationen ließ sich zu allen Zeitpunkten insgesamt wenig Interaktion mit benachbarten Zelltypen, sowie auch untereinander, nachweisen. Trotz der geringen Gesamtzahl an Interaktionen kommt es auch hier erst zu einer Intensivierung, und an Tag 28 zu einer Verringerung der Kommunikationsstärke. Endothelzellen interagierten ab dem dritten Tag verstärkt mit Astrozyten, ab Tag 14 dann wiederum bereits schwächer mit ihrer Umgebung als in der Vergleichsgruppe.

## Abschlussbericht Forschungsförderung der Deutschen Wirbelsäulen-Stiftung 2022 Geförderte: Dr. med. Vanessa Hubertus



**Abb. 8:** Darstellung der Zell-Zell-Interaktionswege im zeitlichen Verlauf nach SCI.

### Diskussion:

Zusammenfassend beschreiben die aufgeführten Ergebnisse das Auftreten und den zeitlichen Ablauf fortschreitender Gewebeschädigung nach SCI bis in weiter entfernte Rückenmarksabschnitte.

Weiterführende detaillierte Analysen der Bestandteile aller hier aufgeführter Signalwege zur Aufschlüsselung von möglichen Wirkmechanismen sind aktuell in Arbeit. Zudem ist eine vertiefende Betrachtung der Vorläufer-Zellen geplant, um möglichst einen multimodalen Ansatz mit dem Ziel eines therapeutischen Anstoßes vaskulärer Regeneration, Eindämmung der Inflammation und letztlich neurologischen Erholung in der peritraumatischen Regenerationszone voranzutreiben.

### Publikation der Ergebnisse:

Wir freuen uns, den ersten Abstract zur Vorstellung der Ergebnisse für die Jahrestagung der DWG in Hamburg 2024 eingereicht zu haben. Zudem sind weitere, nationale und internationale Kongressbeiträge geplant (z.B. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie, der European Association of Neurosurgical Societies, des Global Spine Congress, und der alle zwei Jahre stattfindenden Jahrestagung der International Neurotrauma Society).

Die erste Publikation der Ergebnisse in einem Peer-reviewed Journal soll nach der abschließenden Auswertung der Single-nuclei Datenbank erfolgen, und wird voraussichtlich ab November dieses Jahres vorbereitet werden, sodass mit einer Publikation im Jahr 2025 gerechnet werden kann. Hierbei wird auf

## **Abschlussbericht Forschungsförderung der Deutschen Wirbelsäulen-Stiftung 2022** **Geförderte: Dr. med. Vanessa Hubertus**

ein hochrangiges Neuroscience-Journal abgezielt. Wir freuen uns, Ihnen diese sowie folgende aus dem Projekt entstehende Publikation zukommen zu lassen, und werden die Förderung durch die Deutsche Wirbelsäulenstiftung selbstverständlich jeweils prominent platziert erwähnen.

### Danksagung:

Sehr geehrter Prof. Wilke,  
Sehr geehrter Prof. Schnake,  
Sehr geehrte Damen und Herren,

Ich freue mich, in diesem Abschlussbericht über den erfolgreichen Verlauf des durch die Deutsche Wirbelsäulen-Stiftung geförderten Projekts „Entschlüsselung von Zell-Zell-Interaktionen mit Fokus auf die vaskuläre Regeneration nach traumatischer Rückenmarksschädigung“ berichten zu können und möchte mich in diesem Rahmen vielmals für Ihre Unterstützung zur Umsetzung des Projekts bedanken.

Für Rückfragen stehe ich Ihnen jederzeit gerne zur Verfügung.

Mit freundlichen Grüßen,



Dr. med. Vanessa Hubertus  
Fachärztin für Neurochirurgie  
Charité Universitätsmedizin Berlin  
Charitéplatz 1, 10117 Berlin  
E-Mail: [vanessa.hubertus@charite.de](mailto:vanessa.hubertus@charite.de)